

Die Bestimmung der Glucosekonzentration in 20 Mikroliter Kapillarblut, Liquor und Urin nach der Hexokinase-Methode mit dem Endpunktautomaten 5030 (Eppendorf)

VON R. HAECKEL UND HELLA HAECKEL

Institut für Klinische Chemie (Geschäftsführ. Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Büttner) Medizinische Hochschule Hannover

(Eingegangen am 30. Mai 1972)

Die Glucosekonzentration kann nach der Hexokinase-Methode mit Hilfe des Eppendorf Endpunktautomaten 5030 in Blut, Urin und Liquor mit ausreichender Zuverlässigkeit bestimmt werden. Die Dosierung der Proben kann vom Stationspersonal mit heparinisierten Glaskapillaren (20 µl) durchgeführt werden. Diese können in Eppendorf-Reaktionsgefäßen, die eine entsprechende Vorlage enthalten, per Rohrpost in das Laboratorium geschickt werden.

Bei Urin ist das Mitführen eines Probenleerwertes erforderlich. Soll dieser bei Blutproben vermieden werden, muß ein Enteiweißungsmittel verwendet werden, das eine für Messungen im nahen UV-Bereich genügende Klärung des Überstandes erzielt. Diese Bedingung wird von $\text{Zn}(\text{OH})_2$, nicht jedoch von Perchlorsäure erfüllt.

Obwohl der prozentuale Verschleppungskoeffizient bei 0,9% liegt, muß bei extremen Konzentrationsdifferenzen aufeinanderfolgender Proben innerhalb des linearen Meßbereiches eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch Verschleppungseffekte beachtet werden. Ebenso kann es bei stark lipämischen Proben zu einer erheblichen Verfälschung des Meßwertes kommen. Bei einer Triglyceridkonzentration von 12 mmol/l wird der Überstand durch $\text{Zn}(\text{OH})_2$ noch ausreichend geklärt.

The determination of glucose by the hexokinase method in 20 microlitre samples of capillary blood, cerebrospinal fluid, or urine, using the Eppendorf automatic end point apparatus 5030

The glucose concentration of blood, urine and cerebrospinal fluid can be determined with satisfactory reliability using the Eppendorf automatic end point apparatus 5030. Samples can be taken by ward personnel with heparinized glass capillaries (20 µl). These can be sent by tube post to the laboratory in Eppendorf reaction vessels.

A sample blank is required for urine. In the absence of a sample blank for blood, a deproteinizing agent must be used, which gives clearing of the supernatant for measurements in the near UV; $\text{Zn}(\text{OH})_2$ is suitable, but not perchloric acid.

Although the percent carry over coefficient is 0.9%, extreme concentration differences within the linear measurement range between neighbouring samples in serial determinations can cause inaccurate results due to carry over. Highly lipaemic samples can also lead to considerable inaccuracy; at a triglyceride concentration of 12 mmol/l, the supernatant is still sufficiently cleared by $\text{Zn}(\text{OH})_2$.

Die Glucosekonzentration kann mit Hilfe der gekoppelten Hexokinase/Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Reaktion sowohl im Blut (1, 2) als auch im Urin (3, 4) zuverlässig bei 340 nm bestimmt werden. Die Senkung der Reagenzienkosten sowie eine weitgehende Mechanisierung haben zu einer breiten Anwendung dieser Methode in der klinischen Routinediagnostik geführt.

Im folgenden wird über die Zuverlässigkeit dieser Glucosebestimmung mit dem Endpunktautomaten der Firma Eppendorf-Gerätebau, einem kombiniert-dis-kreten System (5) berichtet. Als ein besonderes Problem hat sich dabei die Probenvorbereitung erwiesen. Soll das Mitführen eines Leerwertes vermieden werden, müssen aus den Proben alle Substanzen entfernt werden, die bei 340 nm Licht absorbieren.

Die im sichtbaren Wellenlängenbereich absorbierenden Stoffe werden mit den üblichen Enteiweißungsmitteln weitgehend abgetrennt. Nach früheren Mitteilungen verschiedener Autoren (6—10) werden bei Blutproben durch Perchlorsäure und Trichloressigsäure einige Proteine (Seromucoid, α_1 -Glycoprotein, Haptoglobin) nicht ausgefällt. Daher haben wir untersucht, ob der Überstand bei den gebräuchlichen Enteiweißungsverfahren

noch Substanzen enthält, die im nahen UV-Bereich (334—366 nm) Licht absorbieren und somit das Ergebnis verfälschen können.

Die Proben werden nach dem von HILGER et al. (11) beschriebenen Verfahren mit heparinisierten Glaskapillaren dosiert.

Material und Methoden

Die Reaktionslösungen für die Bestimmung der Glucose wurden aus der Testkombination Nr. 15931, für die der Triglyceride aus der Testkombination Nr. 15989 von Boehringer Mannheim entnommen. Reduziertes Glutathion wurde ebenfalls von Boehringer Mannheim bezogen, 2,4-Dinitrophenol von Serva Heidelberg, Serum-Albumin vom Rind (trocken, reinst) von den Behringwerken (Marburg), Maleimid von Dr. Th. Schuchard (München), Lerolat N 100 von Bayer AG (Leverkusen), Monitrol von Merz und Dade (München), Keto-Diastix Teststreifen von Miles GmbH (Frankfurt), alle anderen Chemikalien p. a. von der E. Merck AG (Darmstadt) und heparinisierte Glaskapillaren von der Firma Vogel (Gießen).

Geräte

Eppendorf Gerätebau (Hamburg): Zentrifuge 5411 (4 min), Zentrifuge 3200 (2 min), Rotationsmischer 3300, Reagenzdosierer 5231, Endpunktautomat 5030, Reaktionsgefäße 3810.

Spektren zwischen 230 nm und 700 nm wurden in Quarzküvetten mit einem DMR 21 der Firma C. Zeiss (Oberkochen) aufgezeichnet.

Lösungen

1. Zinksulfat (Merck, Best. Nr. 8881) 6 g ad 1000 ml H₂O.
2. Bariumhydroxid, (Merck, Best. Nr. 1737) 16 g ad 1000 ml H₂O. Diese Lösung wird einmal wöchentlich angesetzt und anschließend sofort filtriert (Blauband-Filter Nr. 5893, Schleicher & Schüll).
3. Reduziertes Glutathion, 768 mg ad 10 ml H₂O (0,25 mol/l). Im Kühlschrank mindestens 4 Wochen haltbar.
4. Reaktionslösung (Lösung 1 bis 4 aus der Biochemica Testkombination)

		Endkonzentration im Testansatz:
Lösung 1	95 ml,	Triäthanolamin-Puffer 226 mmol/l, MgSO ₄ 3 mmol/l, pH = 7,5
Lösung 2	4 ml,	NADP 0,38 mmol/l
Lösung 3	4 ml,	ATP 0,51 mmol/l
Lösung 4	1 ml,	Hexokinase 7,9 mg/l, Glucose-6- (Enzymsuspension) phosphat-dehydrogenase 7,9 mg/l
Lerolatlösung	0,1 ml,	80 µl/l
Glutathion (s. o.)	5 ml,	9,91 mmol/l

Die fertige Reaktionslösung hält sich bei 4°C mindestens 24 h, bei Raumtemperatur (22°C) mindestens 7 h.

5. Lerolatlösung, 1 ml Lerolat ad 10 ml H₂O.
6. Leerwertlösung (Lösung 1 und 2 aus der Biochemica Testkombination)

		Endkonzentration im Testansatz:
Lösung 1	100 ml,	Triäthanolamin-Puffer 226 mmol/l, MgSO ₄ 3 mmol/l, pH = 7,5
Lösung 2	4 ml,	NADP 0,38 mmol/l
Glutathion (s. o.)	5 ml,	9,91 mmol/l
Lerolatlösung	0,1 ml	80 µl/l

7. Dinitrophenol-Lösung, 60 mg ad 1000 ml H₂O. In einer dunklen Flasche gut verschlossen mehrere Monate haltbar.
8. Glucose-Standardlösung, 10 mmol/l: 180,16 mg getrocknete Glucose (Merck, Best. Nr. 8337), 100 mg Natriumazid (Merck, Best. Nr. 6688) und H₂O ad 100 ml.
9. Die Präzision der Konzentrationsbestimmung von Harn-glucose wurde mit einer Kontrollprobe überprüft, die folgendermaßen angesetzt wurde: der Inhalt einer Flasche Kontrollurin (Hyland, Charge Nr. 0402 MOOBA 1) wurde in 100 ml Natriumazidlösung (1 g/l) aufgenommen, in Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Jeden Montag wurde der Wochenbedarf (1 Reaktionsgefäß) aufgetaut und im Kühlschrank aufbewahrt.
10. Alkoholische Zinksulfatlösung, 2,4 g ZnSO₄ · 7 H₂O + 200 ml Äthylalkohol (absolut) mit H₂O ad 1000 ml auffüllen.
11. Maleimidlösung: 10 mg/100 ml

Enteweißung mit Zinkhydroxid

In ein Reaktionsgefäß nacheinander dosieren:

- 500 µl ZnSO₄ (Reagenzdosierer)
- 20 µl Probe (Glaskapillare oder Eppendorf Pipette)

Reaktionsgefäß verschließen. Mindestens 5mal kräftig hin- und herschütteln. Die Probe kann jetzt 24 h aufbewahrt werden. Unmittelbar vor der Analyse:

- 100 µl Ba(OH)₂ (Reagenzdosierer)
- 30 s schütteln (Rotationsmischer). Zentrifugieren.

Die mit ZnSO₄-Lösungen vorbereiteten Reaktionsgefäße können (fest verschlossen) bis zu 2 Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Während dieser Zeit ist die Volumenabnahme infolge von Verdunstung kleiner als 1%. Die Glaskapillare verbleibt nach Ausschütteln der Probe im Reaktionsgefäß. Wenn nicht geschüttelt wurde, kann dies vor der Zentrifugation nachgeholt werden. Es sollte jedoch immer darauf geachtet werden, daß der Kapillareninhalt nach der Zentrifugation klar ist (Transparente Reaktionsgefäße, z. B. aus Polypropylen verwenden!).

Die Glucosekonzentration bleibt in der ZnSO₄-Vorlage mindestens 24 h konstant. Danach kommt es bei manchen Kapillarblutproben zu einem allmählichen Abbau dieses Zuckers. Soll das Untersuchungsmaterial über einen längeren Zeitraum in der Vorlage aufbewahrt werden, kann durch Zusatz von Maleimid (10 mg/

100 ml) der Glucoseabfall (12) über mindestens 72 h verzögert werden.

Die Ba(OH)₂-Lösung wird mit einem Reagenzdosierer in die Vorlage pipettiert. Mit Hilfe einer Stahlkanüle (Nr. 1, Außendurchmesser 0,9 mm), die mit einem Entnahmegriffstück (Eppendorf Gerätebau, Bestell Nr. 523081) gehalten und über ein Schlauchsystem mit dem Dosierer verbunden ist, wird der Deckel der Reaktionsgefäße durchstoßen. Dadurch entfällt das Öffnen und Schließen der Reaktionsgefäße. Vor jeder Serie muß das Schlauchsystem entweder gewechselt oder mit 0,1 mol/l HCl durchgespült werden.

Um den Grad der Enteweißung festzustellen, wurde der Überstand manuell in Reaktionsgefäßen aufbereitet und direkt in der Durchflußküvette des Endpunktautomaten bei 334 nm gegen den entsprechenden Reagenzienleerwert gemessen. Rechner und Drucker erfassen die gemessenen Extinktionen auf 3 Dezimalstellen.

Enteweißung mit Perchlorsäure

Die Proben wurden mit heparinisierten Glaskapillaren in Reaktionsgefäße mit 500 µl Maleimidlösung (s. o.) dosiert. Nach Zugabe von 100 µl Perchlorsäure (1,98 mol/l) wurde kurz umgeschüttelt und nach 5 min zentrifugiert. 50 µl Überstand wurden im Endpunktautomaten mit 500 µl Reaktions- bzw. Leerwertlösung versetzt und auf Glucose mit dem Leerwertverfahren (Bilirubin-Programmstecker) analysiert. Der Drucker wurde so eingestellt, daß der Probenleerwert entweder ausgedruckt (Tab. 1) oder vom Analysenwert (Abb. 5) abgezogen wurde.

Reaktionsansatz

In ein Reaktionsgefäß mit Probe-Reagenzdosierer einfüllen:
100 µl Überstand aus der ZnSO₄/Ba(OH)₂-Fällung
500 µl Reaktionslösung

Mischen. Bei Raumtemperatur 20 min inkubieren. Danach photometrische Messung gegen einen Leerwert (100 µl H₂O + 500 µl Reaktionslösung) bei 334 nm.

Der Analysenautomat wird nach Vorschrift der Herstellerfirma bedient (BZ-Programmstecker) und, wenn ein Probenleerwert erforderlich ist, der Bilirubin-Programmstecker verwendet. Die Einstellung der Probenentnahmenadel erfolgt so, daß diese bis 1 cm oberhalb der Probenoberfläche in den Überstand eintaucht. Die Proben werden nach dem in Abbildung 1 dargestellten Schema in die Kette eingesetzt. Diese Probenfolge einer Serie besteht aus einem Anfangssegment A (Kontrolle von Präzision und Standarddrift), sich je nach Bedarf mehrfach wiederholenden Zwischensegmenten B_{1,2}...n und einem Endsegment C. Für Routinebestimmungen kann dieses Schema vereinfacht werden. Den Anfang einer Serie bilden 3 Gefäße mit einer Farbstofflösung (2,4-Dinitrophenol), um einen eventuellen apparativen Fehler von einer Störung der chemischen Reaktion rasch differenzieren zu

Tab. 1
Der durch die Enteweißung mit Perchlorsäure entstehende Fehler bei der Glucosebestimmung

Probenmaterial	Probenleerwert $\Delta E_{334\text{nm}}$ $\bar{x} \pm s$ (n) (Extrembereich)	Durchschnittlicher Fehler bezogen auf eine theoretische Glucosekonzentration von 5 mmol/l*
Kapillarblut (Mensch)	0,007 ± 0,005 (171) (0,001 — 0,016)	8 % (1—18 %)
Kapillarblut (Meerschweinchen)	0,010 ± 0,004 (67) (0,002 — 0,021)	11 % (2—24 %)
Moni-Trol I	0,002 ± 0,001 (5) (0,000 — 0,003)	2 % (0—3 %)
Liquor	0,002 ± 0,002 (5) (0,000 — 0,005)	2 % (0—6 %)

*) Eine wäßrige Glucoselösung von 5 mmol/l, die wie eine Probe behandelt wird, führt zu einer Extinktionsdifferenz von $\Delta E = 0,088$.

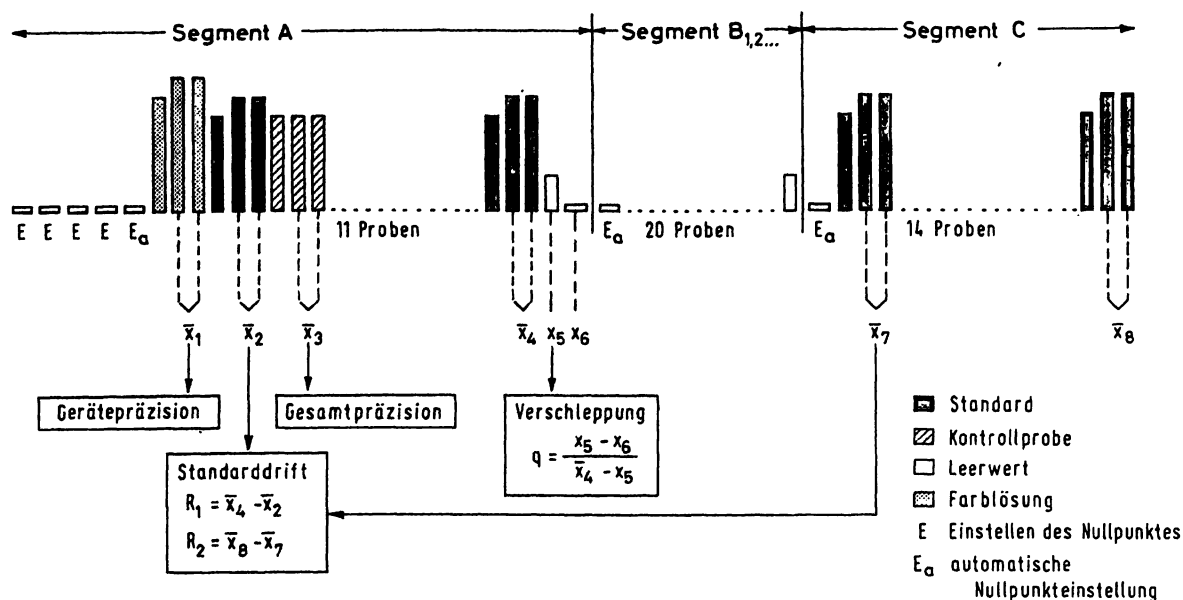


Abb. 1
Probenfolge bei der Glucosebestimmung (ohne Probenleerwert) mit dem Endpunktautomaten 5030

können. Verschleppung und methodische Gesamtpräzision (Kontrollprobe) werden im Anfangssegment der Serie überprüft. Eine Kontrolle der Leerwertdrift erübrigt sich, da in einem Vorversuch über 20 Tage geklärt wurde, daß diese gleich groß wie die Standarddrift ist.

Enteweißung von Urinproben

Die Proteine werden im Urin durch ZnSO_4 bereits ausreichend gefällt. Die Zugabe von $(\text{Ba}(\text{OH})_2)$ kann daher entfallen. Verdünnung und Enteweißung lassen sich somit gemeinsam mit 2 Pipettierungen durchführen. Mit Keto-Diastix wird geprüft, ob im Verhältnis 1:11 ($50 \mu\text{l}$ Urin + $500 \mu\text{l}$ ZnSO_4 , bis zu einer Glucosekonzentration von 20 mmol/l) oder 1:251 ($40 \mu\text{l}$ Urin + 10 ml ZnSO_4 , bis 456 mmol/l) mit ZnSO_4 (6 g/l) verdünnt werden muß.

Wiederfindungsversuch

$500 \mu\text{l}$ Urin, Serum oder heparinisierte Blutproben wurden mit $100 \mu\text{l}$ H_2O (c_1), bzw. mit $100 \mu\text{l}$ Glucoselösung (20 oder 50 mmol/l ; c_2) versetzt und danach wie beschrieben mit $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ enteweiß. Im Überstand wurde die Glucose bestimmt. Die wiedergefundene Glucosemenge errechnet sich aus $c_2 - c_1$. Die Bestimmung der Triglyceride erfolgte nach EGGSTEIN und KREUTZ (13), die der Cholesterinkonzentration nach LEVINE und ZAK (14) mit dem AutoAnalyzer.

Ergebnisse

Probenvorbereitung

HILGER et al. (11) beschrieben ein Verfahren, bei dem die Kapillarblutprobe auf den Stationen vom Pflegepersonal entnommen und per Rohrpost in das Labor verschickt werden kann. Dabei wird die Probe mit einer heparinisierten Glaskapillare in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß dosiert, das im Laboratorium vorher mit $500 \mu\text{l}$ Fluoridlösung gefüllt wurde. Die Enteweißung erfolgt später durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Perchlorsäure ($1,98 \text{ mol/l}$). Bei diesem Vorgehen fällt auf, daß im sauren Überstand Substanzen zurückbleiben, die bei 340 nm mit einem Maximum bei 390 nm absorbieren. Dadurch entsteht ein positiver Fehler, wenn der Überstand bei der Glucosebestimmung in Kapillarblutproben direkt in das enzymhaltige Reaktionsgemisch eingesetzt wird. Ein zweites Maximum wird bei 257 nm beobachtet, das vermutlich

durch Nucleotide bedingt wird. Diese interferieren jedoch nicht mit der Extinktionsmessung zwischen 334 und 366 nm . Auch wenn die Säure erst vorgelegt oder konzentrierter verwendet wird, kommt es nicht zu einer vollständigen Klärung des Überstandes, deren Grad von der Zeit zwischen der Perchlorsäurezugabe und der Zentrifugation abhängt. Es muß mindestens 1 min bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Bei einer Glucosekonzentration von 5 mmol/l errechnet sich der durch die Enteweißung mit Perchlorsäure in Kapillarblut zu erwartende Fehler auf durchschnittlich 8% (Tab. 1). Bei einem geringeren Glucosegehalt würde der Fehler größer, bei einer höheren Glucosekonzentration entsprechend kleiner sein.

Erhöht man die Probenmenge (z. B. auf $100 \mu\text{l}$) bei konstantem Vorlagevolumen ($500 \mu\text{l}$), so nimmt die im Überstand verbleibende, absorbierende Substanz nur gering zu (Abb. 2), so daß deren Verhältnis zu durch Glucose gebildetem NADPH günstiger wird.

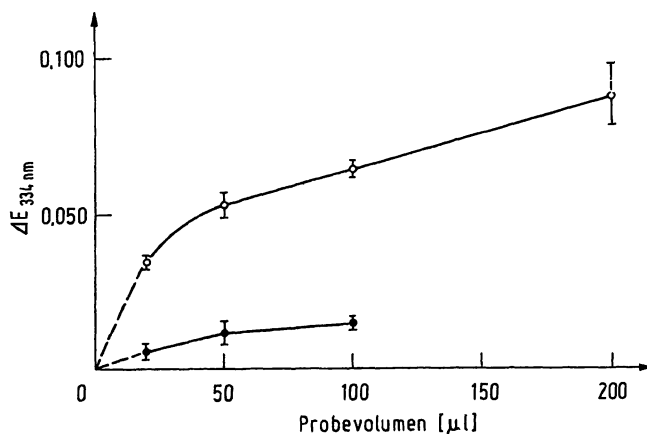


Abb. 2
Der Einfluß des Probevolumens (heparinisiertes Venenblut) auf den Extinktionswert des Überstandes nach der Enteweißung mit Perchlorsäure (○—○, $500 \mu\text{l}$ Perchlorsäure, $0,33 \text{ mol/l}$) und $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ (●—●). $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$)

Tab. 2

Die Extinktionsmessung des Überstandes bei der Enteiweißung von Kapillarblut und Lösungen unterschiedlicher Proteinkonzentration mit ZnSO_4 und Ba(OH)_2 gegen bidest. Wasser

	$\Delta E_{334 \text{ nm}}$		n
	\bar{x}	s	
Kapillarblut	0,003	0,002	20
Monitrol I (Protein: 69 g/l)	0,004	0,001	5
Monitrol I* (Protein: 138 g/l)	0,004	0,001	5
Albuminlösung (100 g/l)	0,003	0,001	5
Albuminlösung (200 g/l)	0,006	0,002	5

*) in der halben Menge Lösungsmittel aufgenommen.

Eine andere Möglichkeit der Deproteinisierung bietet das auf SOMOGYI (15–17) zurückgehende Verfahren mit ZnSO_4 und Ba(OH)_2 , bei dem das Volumenverhältnis von Probe zum Enteiweißungsmittel nicht kritisch ist (Abb. 2). Die direkte Messung des Überstandes bei 334 nm gegen Wasser ergibt auch hier eine geringe Extinktionsdifferenz, die bei Serum und Kapillarblut in der oberen Hälfte des Überstandes jedoch stets unter 0,010 liegt und daher vernachlässigt werden kann (Tab. 2). Bei höherer Proteinkonzentration wird mit diesem Verfahren ebenfalls noch ausreichend enteiweißt (Tab. 2). Zu beachten ist, daß aus der oberen Hälfte des Überstandes abpipettiert wird. Beim Stehenlassen des Überstandes von Blut- und Serumproben kommt es nicht zu einem geringen Ansteigen der Glucosekonzentration wie nach der Behandlung mit Perchlorsäure (Hydrolytische Spaltung von Polysacchariden).

Wird die mit Blut gefüllte Glaskapillare in einer alkoholischen Zinksulfat-Lösung (Tab. 3) ausgeschüttelt, kann sofort abgeschleudert werden. Auch ohne weitere Zugabe von OH-Ionen liegt bei Kapillarblut und Serumproben die direkt gegen H_2O gemessene Extinktionsdifferenz des Überstandes bei 334 nm unter 0,010. Diese Vorlage verdunstet aber bei Raumtemperatur in fest verschlossenen Reaktionsgefäßen mit einer Geschwindigkeit von etwa $1 \mu\text{l/h}$ während der ersten Stunden.

Wolframat-, Sulfosalicylat-, Uranylacetat- und Pikrationen eignen sich wegen ihrer hohen Eigenabsorption bei 340 nm nicht als Enteiweißungsmittel für die Hexokinase-Methode.

Reaktionskinetik

Die Registrierung des Reaktionsablaufes zeigt, daß die NADPH-Bildung im Überstand aus der $\text{ZnSO}_4/\text{Ba(OH)}_2$ -Fällung gehemmt ist. Dieser Effekt wird durch Zusatz von reduziertem Glutathion (Abb. 3) aufgehoben. Die Reaktion kommt bei Raumtemperatur und einer Glucosekonzentration von 10 mmol/l nach etwa 10 min zum Stillstand; auch mit Kapillarblut wurde kein „Schleich“ beobachtet. Enthält die Reaktionslösung Glutathion, müssen wäßr. Glucoselösungen wie Proben mit ZnSO_4 und Ba(OH)_2 behandelt werden, da sonst eine rückläufige Schleichreaktion auftritt.

Präzision der Methode

Die Glucosekonzentration wurde in verschiedenen Standardlösungen und Kontrollproben an mehreren Tagen dreifach mit dem Endpunktautomaten 5030 be-

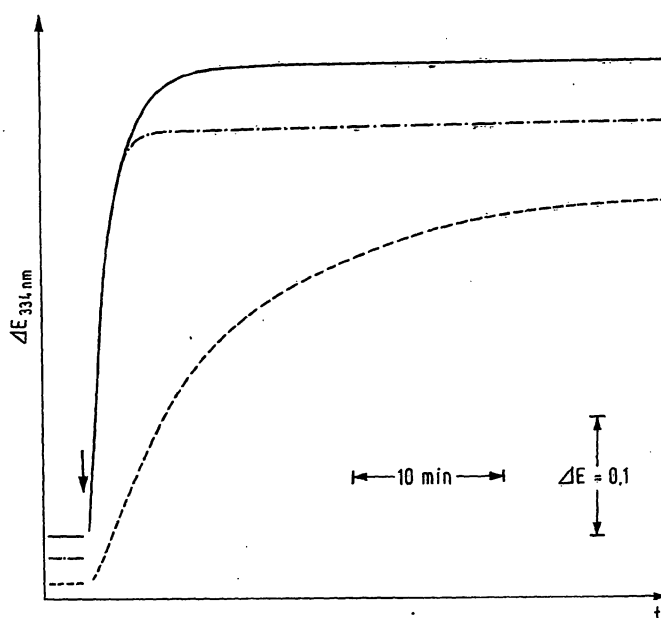


Abb. 3

Der Ablauf der Glucosereaktion bei 334 nm. 20 μl einer wäßr. Glucoselösung (10 mmol/l) wurden wie unter Methodik angegeben mit $\text{ZnSO}_4/\text{Ba(OH)}_2$ behandelt. Nach dem Abschleudern wurden 100 μl des Überstandes (Pfeil) zu 500 μl Reaktionslösung (mit — — — — — und ohne — — — — — Glutathion) gegeben. Bei der Kontrolle (—) wurden 20 μl der Glucoselösung mit 600 μl bidest. H_2O verdünnt (Die Reaktionslösung enthielt kein Glutathion). Küvettemperatur: 20°C

Tab. 3

Die Effektivität verschiedener kationischer und anionischer Enteiweißungsmittel bei der Probenvorbereitung für die mechanisierte Bestimmung der Glucosekonzentration mit der Hexokinase-Methode. 20 Mikroliter Monitrol I bzw. heparinisertes Humanblut wurden in 500 μl Enteiweißungsmittel dosiert. Rotationsmischer: 2 min. Zentrifugation: 2 min, 12000 U/min. Der Überstand (obere Hälfte) wurde bei 334 nm gegen bidest. H_2O gemessen bzw. für kinetische Untersuchungen (500 μl Reaktionslösung + 50 μl Überstand) verwendet

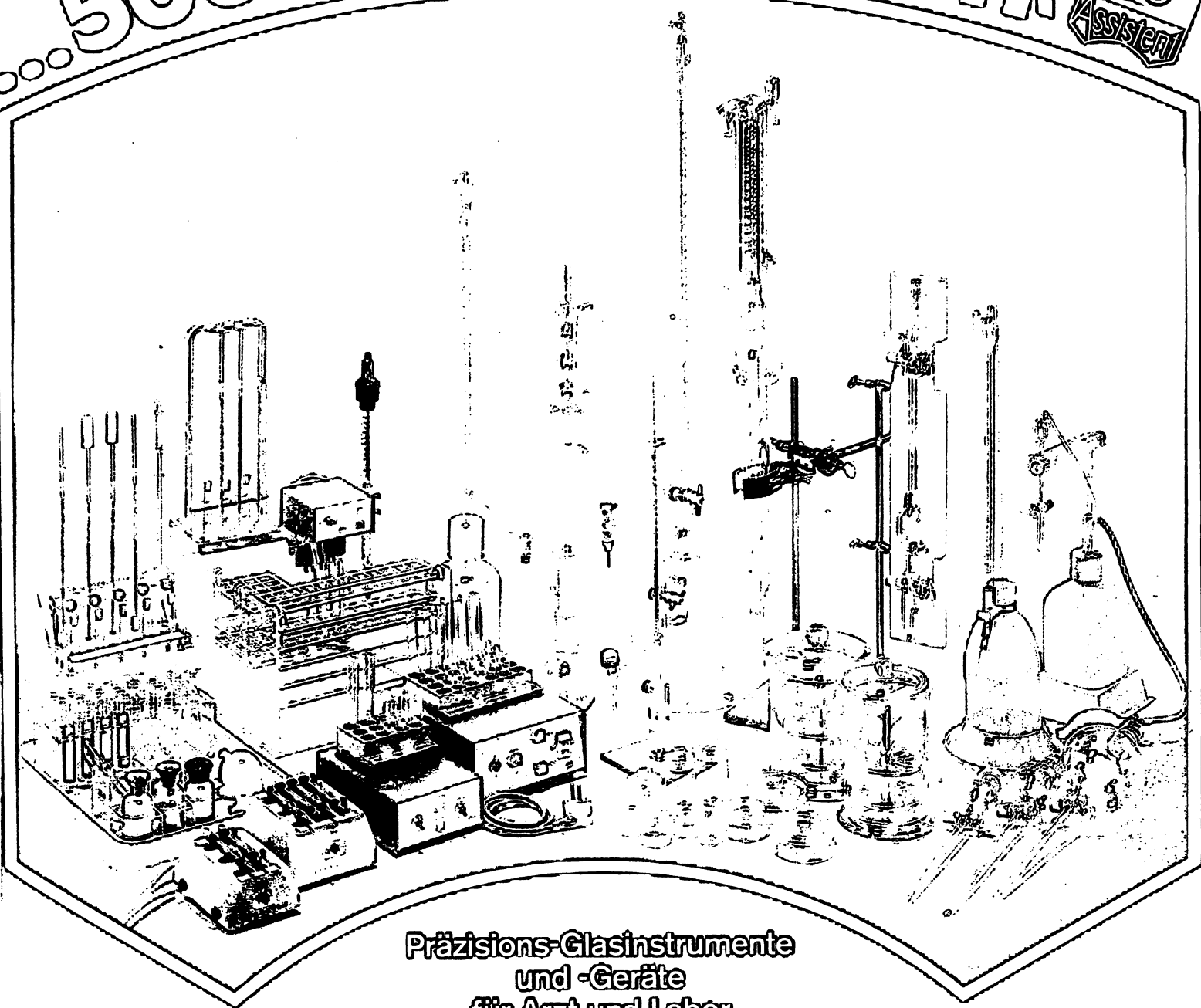
Enteiweißungsmittel	$\Delta E < 0,010$		Hemmung der Hexokinase-/Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Reaktion	Bemerkung
	Monitrol I	Blut		
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, gesätt.	nein	nein	+	
Trichloressigsäure 10 g/100 ml	ja	ja	+++	
Perchlorsäure 0,33 mol/l	nein	nein	+	
Metaphosphorsäure 1 g/100 ml	ja	ja	+))	unstabil
$\text{ZnSO}_4 + \text{Ba(OH)}_2$	ja	ja	+++)	2 Dosierungen
$\text{ZnSO}_4 + \text{Äthanol}$	ja	ja	+++)	verdunstet zu rasch

) Teilweise umkehrbar durch Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration.

) Umkehrbar durch Glutathion.

Ein kleiner Ausschnitt aus dem großen Assistent-Programm.
Insgesamt führen wir mehr als...

...5000 Assistenten



Präzisions-Glasinstrumente und -Geräte für Arzt und Labor

Wir führen folgende Artikel-Gruppen:

Blutuntersuchungs-Instrumente

Blut, Enzymat, Kapillar-Pipetten aller Art; auch mit Toleranzangabe auf dem Gerät und amtlich geeicht. Zählkammern in Präzisionsausführung sowie amtlich geeicht. Blutsenkungsapparate, Haemometer, Pipetten-Schüttelgeräte usw.

Labortabletts

für Blutbild und Blutzucker; Medikamententablett

Urinprober, Ureometer, Albuminimeter, Zentrifugen- und Urinmeßgläser

Maßanalytische Geräte, Mikropipetten für Einmalgebrauch, Meßzylinder, Messuren, Meßflaschen, Büretten – auch mit automatischer Nullpunkt-Einstellung z.B. nach Schilling; Titrierapparate – auch als Spezialmodell für Reagenzien-Flaschen (Merck u.a.); Mikrobüretten, Meß- und Vollpipetten usw. – auch mit Toleranzangabe auf dem Gerät und amtlich geeicht

Färbegeräte

Schalen, Gestelle, Tröge, Einsätze (auch für die Papanicolaou-Färbung), Blöcke, Kästen, Küvetten, Besteck für Schnell-Färbung u.a.

Reagenzgläser in verschiedenen Glasqualitäten sowie vielen Größen und Ausführungen

Aufbewahrungsgestelle aus Holz und Plexiglas für Reagenzgläser, Zentrifugengläser und Küvetten; ferner für Pipetten in verschiedenen Größen

Mikroskopische Deckgläser und Objektträger

Instrumentenschalen, Wattezyylinder, Standzylinder, Glasdosen usw.

• Versandgefäße für infektiöses Material usw.

Thermostate, Veraschungsgestelle

Schliffgeräte, Hähne, Kühler, Scheidetrichter usw.

Parnas-Wagner-Geräte für die Kjeldahl-Rest-N-Bestimmung

Wasserbadgestelle aus Edelstahl oder Messing vernickelt; rund oder rechteckig

Sämtliche Assistent-Erzeugnisse erhalten Sie im Fachgeschäft.

Bitte beachten Sie unsere
weiteren Informationen auf der Rückseite



Kapillaren für Einmalgebrauch – mit Ringmarke – Selbstfüllung durch Kapillar-Wirkung

Assistent-Mikropipetten



Artikel No. 555

Assistent-Mikropipetten ersparen das lästige, zeitraubende Reinigen. Denn sie sind für Einmalgebrauch bestimmt. Rationelle Arbeitsweise – vorteilhafter Preis!

Assistent-Mikropipetten sind von höchster Präzision. Sie entsprechen nach § 6.1.1. der Eichpflicht-Ausnahmereverordnung sinngemäß den einschlägigen Vorschriften der Eichordnung.

Assistent-Mikropipetten gibt es in 6 verschiedenen Größen: 5 cmm, 10 cmm, 20 cmm, 25 cmm, 50 cmm und 100 cmm. Jede Packung enthält 250 Mikropipetten sowie einen Latex-Schlauch mit Mundstück und Adapter.

Sämtliche Assistent-Erzeugnisse erhalten Sie im Fachgeschäft. (Ihr Fachhändler hat auch unseren großen Katalog zur Verfügung; er enthält mehr als 5.000 verschiedene Präzisions-Glasinstrumente und -Geräte für Arzt und Labor!)

Glaswarenfabrik

Karl Hecht

Präzisions-Glasinstrumente
und -Geräte für Arzt und Labor



D 8741 Sondheim/Rhön
Tel. (09754) 259
Telex 0672865

D 7024 Bernhausen/Stuttgart
Tel. (0711) 793533
Telex 7255625

CH 8595 Altnau TG/Schweiz
Tel. (072) 67222

F 92 Le Plessis-Robinson/Paris
84 Rue Bernard Iskè, Tel. 655701

A 6122 Fritzens/Tirol
Bergstraße 6, Tel. (05224) 2646

Tab. 4

Präzision der Glucosebestimmung mit dem Endpunktautomaten. Die Proben wurden entweder in jeder Serie wie unter Methodik beschrieben enteiweißt (A) oder in einem großen Ansatz (B) mit $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ versetzt und zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes B wurde täglich in den Automaten eingesetzt und wie jede Probe dreifach bestimmt: aus dem 2. und 3. Wert wurde die Präzision in der Serie, aus dem 2. Wert die Präzision von-Tag-zu-Tag berechnet. C: Glucosebestimmung mit Probenleerwert. Die Probenvorbereitung erfolgte nach Verdünnungsstufe I oder II

Probe		Präzision in der Serie			Präzision von Tag zu Tag				
		\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	n	VK _s [%]	\bar{x} [mmol/l]	s [mmol/l]	n	VK _d [%]
A	Kontrollserum (Behring)	5,73	0,07	53	1,3	5,73	0,11	55	2,0
B	wäßr. Standard	1,03	0,04	20	3,4	1,04	0,08	19	6,8
		2,03	0,03	20	1,4	2,03	0,07	21	3,3
		5,04	0,05	22	0,6	5,05	0,08	22	1,7
		10,00	0,05	18	0,5	10,01	0,12	18	1,2
		24,16	0,11	21	0,5	24,64	0,31	17	1,2
C	Kontrollurin ⁻ (I)	4,81	0,11	24	2,3	4,81	0,16	24	3,3
	wäßr. Standard (I)	25,16	0,19	20	0,8	24,97	0,32	20	1,3
	wäßr. Standard (II)	204,48	1,16	20	0,6	204,60	3,97	20	1,9

stimmt. Der erste Wert wurde wegen eventueller Verschleppungseffekte verworfen. Der zweite und dritte Wert diente zur Ermittlung der Präzision in der Serie und der von-Tag-zu-Tag (Tab. 4).

Unter den gleichen Bedingungen wurde die Streuung in der Serie von Leerwerten (Wasser als Probe) an 20 Tagen ermittelt. Die dreifache Standardabweichung ist nach KAISER (18) ein Maß für die Nachweisgrenze: 0,1 mmol/l. Wenn die Probendosierung auf der Station, also nicht durch technische Assistentinnen erfolgt, ist eine regelmäßige Unterweisung des Proben abnehmenden Personals erforderlich. Wir haben 30 Mitarbeiter unseres Routinelabors nach einmaliger Einweisung in die Handhabung der Glaskapillaren aus 2 Kontrollproben je 1 Probe entnehmen lassen, die Glucosekonzentration mit dem Endpunktautomaten in einer Serie bestimmt und die Streuung der Einzelwerte berechnet. Dabei wurde ein Variationskoeffizient von 2,6% mit Asid-Kontrollserum (4,6 mmol/l) und von 1,7% mit Monitrol II (13,6 mmol/l) erreicht. Dieser Versuch zeigt, daß die Streuung um etwa das zweifache ansteigt, wenn die Dosierung durch verschiedene Personen erfolgt. Trotz-

dem ist die Präzision unter diesen Bedingungen noch zufriedenstellend.

Richtigkeit

Die Eichkurve verläuft bis zu einer Konzentration von 30 mmol/l weitgehend linear (Abb. 4). Jedoch sollten Proben ab 25 mmol/l verdünnt werden (50 µl Überstand + 500 µl ZnSO_4 -Lösung), da bei höheren Konzentrationen gelegentlich eine geringe Schleichreaktion beobachtet wird.

Eine Serie von etwa 120 Patientenproben wurde mit Perchlorsäure und $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ deproteinisiert und anschließend im Endpunktautomat 5030 auf Glucose analysiert. Bei Perchlorsäure-Enteilweißung wurde ein Probenleerwert vom Ergebnis abgezogen (Bilirubin-Programmstecker). Das Ergebnis der Regressionsanalyse ist in Abb. 5 dargestellt.

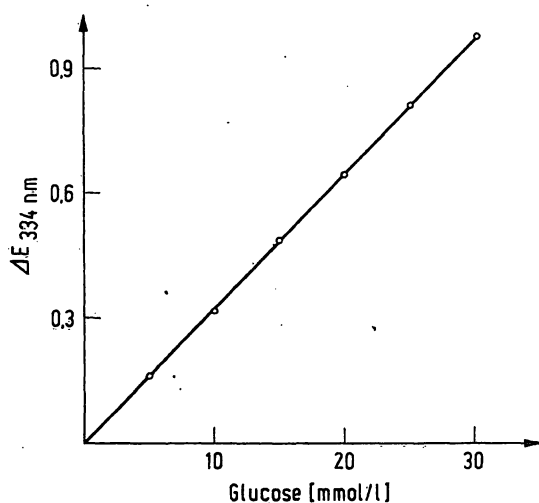


Abb. 4

Eichgerade bei der Glucosebestimmung. Glucoselösungen mit verschiedenen Konzentrationen wurden wie Proben behandelt, nach $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Zugabe abgeschleudert und anschließend im Endpunktautomaten analysiert. Es handelt sich um Mittelwerte aus 5 Bestimmungen

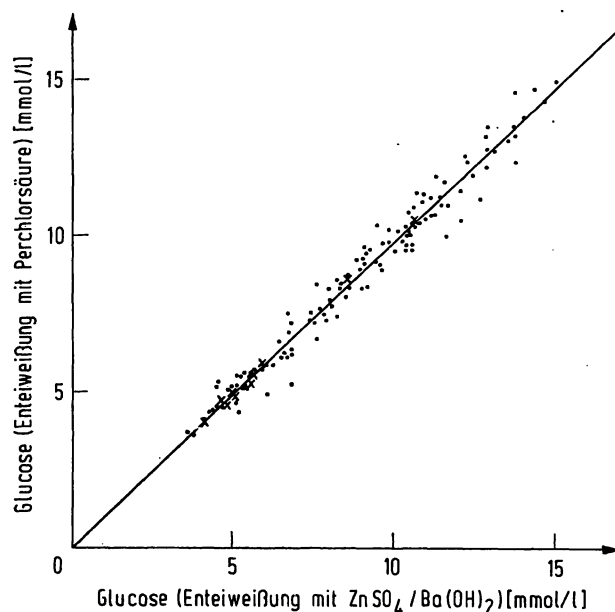


Abb. 5

Korrelation der mit der Hexokinase-Methode gefundenen Glucosekonzentrationen bei unterschiedlicher Enteiweißung. Bei der Enteiweißung mit Perchlorsäure wurde ein Probenleerwert vom Ergebnis abgezogen und Glutathion in der Reaktionslösung durch Triäthanolamin-Puffer ersetzt. Einige trübe und lipämische Seren (Kreuze) wurden ebenfalls untersucht
 $y = 0,9863x + 0,0805$; $r = 0,9840$

Die Richtigkeit des modifizierten Verfahrens wurde außerdem durch Wiederfindungsversuche geprüft, deren Ergebnisse in Tabelle 5 zusammengestellt sind.

Vor kurzem hatten wir berichtet, daß eingewogene Glucosemengen um etwa 4% zu hoch wiedergefunden werden, wenn das Ergebnis mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH, bzw. NADPH bei 366 nm berechnet wird (19). Dieser Befund wurde inzwischen auch von anderer Seite bestätigt (20). Wird bei 334 nm gemessen, wird die eingewogene Glucosemenge annähernd wiedergefunden (19). An 60 Tagen ermittelten wir mit einer wäßrigen Glucoselösung von 10 mmol/l den Berechnungsfaktor, mit dem die erhaltenen Extinktionsdifferenzen unter unseren Bedingungen zu multiplizieren sind: $30,85 \pm 0,42$. Dieser Wert stimmt mit dem theoretischen Wert von 31,00 ($\epsilon_{334\text{ nm}} = 6 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (21)) gut überein.

Die Genauigkeit der Glaskapillaren wurde durch 10 Auswägungen mit bidest. Wasser an einer Halbmikrowaage (Sartorius) geprüft: $19,94 \pm 0,45 \mu\text{l}$. Der Variationskoeffizient betrug 0,2%, die Abweichung vom Sollwert -0,3% (Die Raumtemperatur wurde bei den Berechnungen berücksichtigt).

Die Eiweißpräzipitation führt zu einem Volumenverdrängungsfehler. Der durch das Erythrocytenvolumen bewirkte Fehler beträgt unter unseren experimentellen Bedingungen bei Kapillarblut etwa 0,5% und kann entsprechend berücksichtigt werden (22). Diese Korrektur erscheint jedoch fraglich, da 2 Größen (spezifisches Gewicht und Flüssigkeitsgehalt des Blutes) verwendet werden, deren Konstanz bei Patientenblut nicht gewährleistet ist. Aus den gleichen Gründen beachten wir den durch die Fällung der Proteine verursachten Volumenfehler nicht, der im Mittel 0,16% beträgt, wenn man für das spezifische Volumen der Serumproteine einen durchschnittlichen Wert von 0,725 einsetzt (23).

Verschleppungseffekte

Der prozentuale Verschleppungskoeffizient (Q) nach Hjelm (24) wurde wie kürzlich beschrieben (25) an 20 Tagen aus einer täglichen Serie von Glucoselösungen (je 5 mal 2 mmol/l, 20 mmol/l, 2 mmol/l) bestimmt (Abb. 6). Der prozentuale Koeffizient für die Verschleppung von niedrigen zu hohen Konzentrationen (Q_1) und für die Verschleppung von hohen zu niedrigen Konzentrationen (Q_2) sind etwa gleich groß und liegen im Durchschnitt bei 0,9% (Abb. 6).

Aus den Q-Werten kann nicht ohne weiteres ersehen werden, ob bei einer Methode Verschleppungsfehler vernachlässigt werden dürfen. Daher haben wir kürzlich (25) ein Verfahren vorgeschlagen, mit dessen Hilfe die graphische Darstellung eines sogenannten verschleppungssicheren Bereiches möglich ist. Dabei wird die Verschleppung mit der methodischen Streuung in Beziehung gesetzt. Ermittelt man so den verschleppungssicheren Bereich, zeigt sich, daß dieser nicht den ganzen Meßbereich umfaßt (Abb. 6). Bei Werten über 10 mmol/l sollte überlegt werden, ob die nachfolgende Analyse,

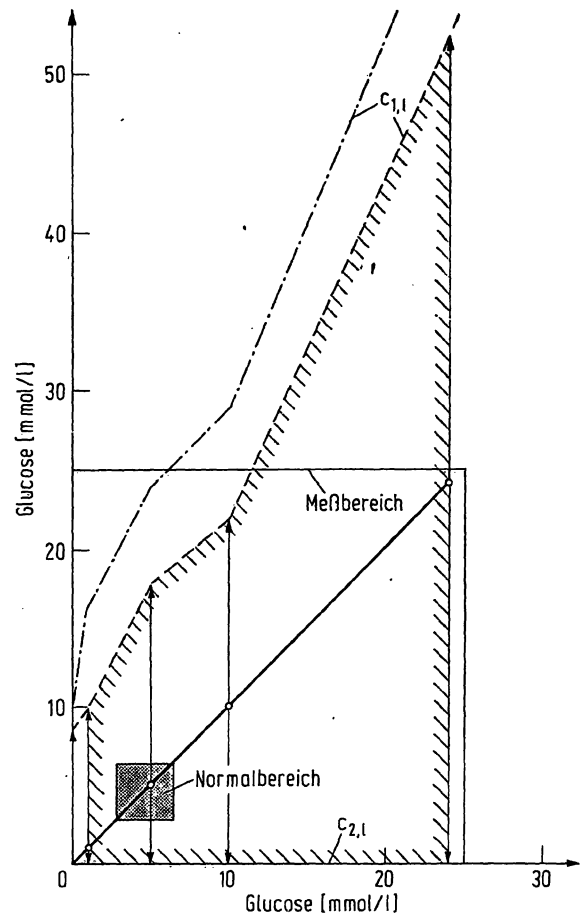


Abb. 6

Der verschleppungssichere Bereich (gestrichelte Linie) bei der Glucosebestimmung mit dem Endpunktautomaten 5030

Die Grenzkonzentrationen für die Verschleppung von niedrigen zu hohen ($c_{1,1}$) und von hohen zu niedrigen Konzentrationen ($c_{2,1}$) zu den durch Punkte markierten Konzentrationen wurden nach l. c. (25) berechnet. Die entsprechenden Standardabweichungen wurden der Tabelle 4 entnommen. Den Berechnungen liegt das Postulat zugrunde, daß der Verschleppungsfehler kleiner als der zweifache Bereich (— — —), bzw. kleiner als der dreifache Bereich (— · —) der methodischen Streuung in der Serie (Standardabweichung) sein soll. Prozentuale Verschleppungskoeffizienten $Q_1 = 0,9 \pm 0,6\%$, $Q_2 = 0,8 \pm 0,2\%$ (Mittelwerte von 20 Bestimmungen an verschiedenen Tagen mit Standardabweichung)

falls deren Konzentration unter 10 mmol/l liegt, wiederholt werden muß. So darf z. B. eine Probe mit 5 mmol/l Glucose auf eine andere mit einer Konzentration von bis zu 18 mmol/l folgen, ohne daß der Verschleppungsfehler berücksichtigt werden muß. Hat die vorangehende Probe einen höheren Glucosegehalt, muß die nachfolgende Messung entweder wiederholt oder korrigiert werden. Verschleppungsfehler von niedrigen zu hohen Konzentrationen können innerhalb des ganzen Meßbereiches vernachlässigt werden (Abb. 6). Liegt ein Wert außerhalb des Meßbereiches, muß die nachfolgende Probe grundsätzlich nochmals analysiert werden. Dieses Prinzip gilt aber für alle Methoden, die mit Verschleppungsfehler behaftet sind.

Drift

Um den Aufwand einer Driftkorrektur zu vermeiden, wählen wir die Segmentlänge in einer Serie so, daß die Extinktionswerte einer Standardlösung, die etwa im mittleren Meßbereich liegt, nicht mehr als 1% zu- oder abnehmen. An 20 Tagen driftete das Ergebnis einer

10 mmol/l Glucoselösung nach 20 Proben im Anfangssegment im Durchschnitt um 0,6%. Auch nach einigen Zwischensegmenten nahm im Endsegment diese Drift nicht zu. Daher ist eine einmalige Driftkontrolle im Anfangssegment einer Serie ausreichend.

Interferenzen

BARTHELMAI (26) untersuchte den Einfluß von Bilirubin, Lipiden, Sulfonamiden und einer Reihe anderer Medikamente auf die Hexokinase- und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Reaktion. Dabei wurde keine Interferenz festgestellt. Fructose führt wegen der Verunreinigung der Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (4) an Phosphohexoseisomerase zu einem positiven Fehler, der allerdings nur bei hohen Fructosekonzentrationen beachtet werden muß: 20 mmol/l Fructose bewirken eine scheinbare Glucosekonzentration von 0,53 mmol/l. Selbst bei Infusion dieses Zuckers ist somit eine grobe Fehlbestimmung der Glucose nicht zu erwarten. Reduziertes Glutathion aktiviert unter den vorgeschlagenen Testbedingungen den Fructoseumsatz nicht.

Eine erhebliche Interferenz kann bei extrem lipämischen Blutproben auftreten, da der Überstand nach der Entweißung bei 334 nm noch Licht absorbiert (Tab. 6).

Allerdings wird der zu erwartende Fehler bei einer Glucosekonzentration von 5 mmol/l erst mit Triglyceridkonzentrationen, die über 18 mmol/l liegen, größer als 3%. Extrem hohe Triglyceridwerte können jedoch zu einer fatalen Verfälschung der Ergebnisse führen. In solchen Fällen kann man 1,5 ml Serum in Reaktionsgefäßen etwa 1 h zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 5411, Nenndrehzahl 16000 U/min, etwa 12000 g). Danach wird die oberste Fettschicht vorsichtig mit einer Pipettenspitze oder einem Spatel abgehoben und aus dem unteren Drittel mit einer Eppendorf Pipette 200–300 µl Serum entnommen. Dieses Aliquot eignet sich sowohl für die Bestimmung von Enzymaktivitäten als auch von verschiedenen Metaboliten. Bei diesem Vorgehen lag die Extinktion des Überstandes nach der $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Entweißung bei einer Serumprobe, die 37,38 mmol/l Triglyceride enthielt, unter 0,010 ($\bar{x} = 0,005$, $s = 0,002$, $n = 5$).

Liquor

Das oben beschriebene Verfahren eignet sich auch für die Bestimmung der Glucosekonzentration in Liquor. 15 Proben von verschiedenen Patienten wurden sowohl mit Perchlorsäure als auch mit $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ entweißt und der Überstand im Endpunktautomat 5030

Tab. 5

Wiederfindung von Glucose in Blut-, Urin- und Serumproben. Es handelt sich um Mittelwerte (mmol/l) aus 5 Bestimmungen. Experimentelle Bedingungen: Siehe unter Methodik

Probe	Glucosekonzentration ohne Zusatz	Addierte Glucosekonzentration	Wiedergefundene Glucosekonzentration	Differenz
Blut	4,06	3,33	3,31	– 0,6 %
Blut	3,26	3,33	3,35	+ 0,6 %
Serum	6,42	3,33	3,33	0
Urin	0,22	3,33	3,36	+ 0,9 %
Urin	0,64	3,33	3,34	+ 0,3 %
Urin	6,22	8,33	8,30	– 0,4 %

Tab. 6

Der Einfluß von Lipiden auf die Extinktion des Überstandes nach der $\text{ZnSO}_4/\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Behandlung von Kapillarblut und Serum eines Patienten mit einer Hyperlipämie. Die Proben wurden an verschiedenen Tagen entnommen

Probe	ΔE_{334} \bar{x} (s), n = 5	Zu erwartender Fehler bei einer Glucosekonzentration von 5 mmol/l	Triglyceridkonzentration im Serum, mmol/l ¹⁾	Cholesterinkonzentration im Serum, mmol/l ¹⁾
Kapillarblut	0,002 (0,001)	0,2 %	6,79	8,4
Serum	0,375 (0,214)	39 %	37,38	14,3
Verdünntes Serum ²⁾	0,024 (0,003)	2,5 %	18,69 ³⁾	7,2 ³⁾
Verdünntes Serum ²⁾	0,009 (0,004)	0,9 %	12,46 ³⁾	4,8 ³⁾
Verdünntes Serum ²⁾	0,005 (0,002)	0,5 %	9,35 ³⁾	3,6 ³⁾
Verdünntes Serum ²⁾	0,005 (0,001)	0,5 %	6,23 ³⁾	2,4 ³⁾
Albuminlösung 7 g/100 ml	0,004 (0,001)	0,4 %	0,16	

¹⁾ Mittelwert aus Doppelbestimmungen.

²⁾ 100 µl Serum + 100, 200, 300 oder 500 µl Albuminlösung (7 g/100 ml bidest. H₂O).

³⁾ berechnet.

auf seinen Glucosegehalt untersucht; der berechnete Korrelationskoeffizient betrug

$$r = 0,9653 \quad (y = 1,0106 \cdot x - 0,1481,$$

y-Werte: Enteiweißung mit Perchlorsäure).

Urin

Die von uns getesteten Enteiweißungsmittel entfernen nicht alle bei 334 nm absorbierenden Substanzen aus dem Überstand. Deshalb ist es beim Endpunktautomaten unerlässlich, einen Probenleerwert (50 µl Überstand + 500 µl Leerwertlösung) mitzubestimmen (Bilirubin-Programmstecker). Dieser lag bei 79 Patienten zwischen $\Delta E = 0,005$ und $\Delta E = 0,104$ ($\bar{x} = 0,034$). Präzision (Tab. 4) und Nachweisgrenze (0,15 mmol/l) werden durch das Mitführen des Probenleerwertes etwas beeinflusst. Wir begrenzen die Segmentlänge hier ebenfalls auf 20 Proben und überprüfen danach den Nullabgleich der beiden Durchflußküvetten. Die Leerwertlösung kann nicht durch Wasser oder Puffer ersetzt werden. Aufgestockte Glucosemengen wurden mit Abweichungen von weniger als 1% wiedergefunden (Tab. 5).

50 Patientenurine wurden mit Perchlorsäure und mit $ZnSO_4$ enteiweißt und im Endpunktautomaten auf den Glucosegehalt untersucht. Dabei fand sich eine ausreichende Korrelation ($y = 0,9777x + 0,0647$, $r = 0,9976$, y-Werte: Enteiweißung mit Perchlorsäure).

Da die Glukosekonzentration im Urin wesentlich stärker schwankt als im Blut, ist die Beachtung des Verschleppungsfehlers hier besonders wichtig. Die Probenkette wird daher so zusammengestellt, daß nach den Kontrollproben zuerst ein Wasserwert, dann die Diastix-negativen und zuletzt die -positiven Proben eingesetzt werden.

Diskussion

Die Bestimmung der Glukosekonzentration mit der Hexokinase-Methode wird in biologischen Materialien meist nach Abtrennung der Proteine durchgeführt. Bei Verwendung der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase für die Indikatorreaktion wird heute mit Perchlorsäure (2), bei Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase als Hilfs- bzw. Indikatorenzym mit Trichloressigsäure (27) enteiweißt. In Blutproben kann die Hexokinase-Methode auch nach vorheriger Hämolyse ohne Ausfällung der Proteine (12, 28, 29) durchgeführt werden. Dieses Verfahren läßt sich jedoch vorerst nur mit Flow-Systemen mechanisieren.

Ein für die Mechanisierung der Hexokinase-Methode ideales Enteiweißungsmittel sollte

1. keine Eigenabsorption haben,
2. alle zwischen 334 und 366 nm absorbierenden Substanzen ausfällen,
3. nur einen Pipettierschritt erfordern,
4. die im Überstand durchzuführenden Reaktionen nicht hemmen und
5. einige Wochen haltbar sein.

Die Beständigkeit eines frisch angesetzten Fällungsmittels spielt dann eine Rolle, wenn die Proben nach dem von HILGER et al. (11) beschriebenen Verfahren vom Pflegepersonal auf den Stationen dosiert werden sollen. Keines der von uns für die Glucosebestimmung nach der Hexokinase-Methode untersuchten Enteiweißungsmittel (Tab. 3) erfüllt die genannten Bedingungen vollständig, so daß bei der Wahl eines der üblichen Verfahren immer ein Kompromiß eingegangen werden muß.

Trichloressigsäure bewirkt zwar bei der Enteiweißung von Blutproben eine geringere Extinktionsdifferenz bei 334 nm als Perchlorsäure, kann aber nicht verwendet werden, da sie die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase stark hemmt. PFLEIDERER und GREIN (27) beschrieben ein Verfahren zur Glucosebestimmung, bei dem im Trichloressigsäure-Überstand das bei der Hexokinase-reaktion entstehende ADP mit Hilfe der Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase nachgewiesen wird. Bei dieser Methode wird jedoch die Unspezifität der Hexokinase nicht durch die nachfolgende Indikatorreaktion ausgeglichen.

Mit Metaphosphorsäure (30) und alkoholischer Zinksulfatlösung wird zwar der Überstand von Blutproben ausreichend geklärt, jedoch ist bei diesem Enteiweißungsmittel die Vorlage für den Routinebetrieb eines großen Klinikums bei Raumtemperatur nicht beständig genug. Unter solchen Bedingungen erscheint die Ausfällung der Proteine mit $ZnSO_4$ und $Ba(OH)_2$ am zuverlässigsten. Allerdings sind dabei 2 Pipettierschritte erforderlich.

$Ba(OH)_2$ kann nur bei Kapillarblut (15) und klaren Seren durch NaOH (0,1 mol/l) ersetzt werden. Bei lipämischen und stark getrübbten Seren sind Bariumionen für eine ausreichende Klärung des Überstandes erforderlich.

Das Verfahren von HILGER et al. (11) zur Proben-gewinnung eignet sich in der hier vorgeschlagenen Modifikation auch für andere enzymatische Methoden, z. B. für die Galaktose- und die Alkoholbestimmung. Dadurch ist es möglich aus einer einzigen Probe von 20 µl Blut mehrere Substanzen zu bestimmen.

Die Probenvorbereitung läßt sich mit Hilfe von Reagenzdosierern und Rotationsmischer ebenfalls rationalisieren. Die in Kettenglieder eingesetzten Reaktionsgefäße werden nach der Zentrifugation en bloc in den Analysenautomaten eingesetzt, der ein Aliquot direkt vom Überstand absaugt. Unter den beschriebenen Bedingungen lassen sich in der Stunde 120 Kapillarblut- und Liquor-, bzw. 60 Urinproben zuverlässig untersuchen. Lediglich bei extremen Konzentrationsdifferenzen in aufeinanderfolgenden Proben sind Verschleppungseffekte zu beachten.

Eine Nichtbeachtung des Verschleppungsfehlers kann, selbst wenn dieser bis zur dreifachen Standardabweichung der methodischen Streuung (siehe l. c. (25)) toleriert wird (Abb. 6), in Extremfällen zu einer erheblichen Verfälschung der Ergebnisse führen, obwohl der prozentuale Verschleppungskoeffizient unter 1% liegt. So

Neuerscheinungen

Hilde Götz

**Antigenität von
Tumorproteinen**

Oktav. XII, 126 Seiten mit 19 Abbildungen und 6 Tabellen. 1972 Gebunden DM 60,—

Die Monographie versucht, aus der Komplexität der Probleme der Immunonkologie Wesen und klinische Bedeutung der Antigenität von Tumorproteinen darzulegen.

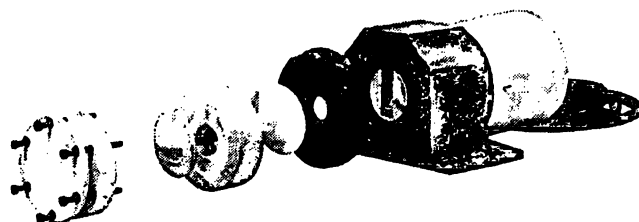
Hilde Götz

**Immunologische
Plasmaprotein-
Diagnostik**

Oktav. 256 Seiten. Mit 106 Abbildungen. 1973. Gebunden DM 96,—

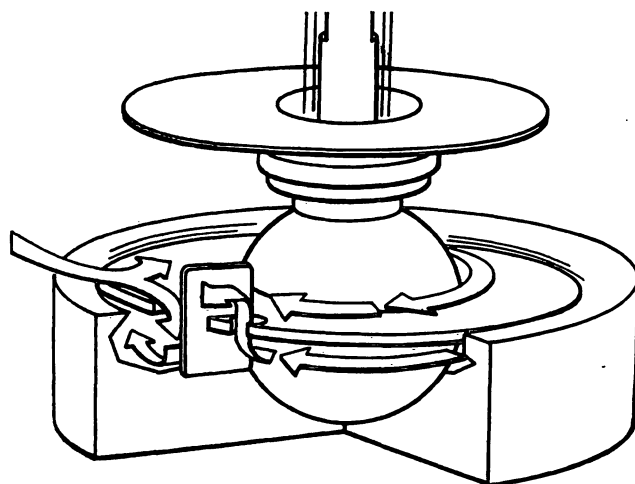
Das Buch vermittelt Methodik und klinischen Anwendungsbereich der wichtigsten immunologischen Untersuchungstechniken zur Differenzierung menschlicher Plasmaproteine. Es werden die Immunelektrophorese (Grabar und Williams bzw. Scheidegger) mit reichlichem Anschauungsmaterial und Interpretationshilfen, die zweidimensionale Doppel-Immundiffusion (Ouchterlony) sowie die einfache, radiale Immundiffusion im Agargel (Mancini und Mitarb.) dargelegt.

Saturn-Pumpen



Wir stellen Ihnen eine gänzlich aus Teflon gefertigte Pumpe vor. Der Name kommt von ihrer Bauart. Das Kernstück ist eine Teflonkugel mit Scheibe. Die Bewegung besteht in einer taumelnden 360° Drehung der Scheibe innerhalb einer kreisförmigen Kammer. Die Kammer wird durch eine radial angebrachte Scheibe unterteilt. Diese trennt den Ansaugteil vom Austrittsteil und eliminiert so die Notwendigkeit von Ventilen und Kugeln. Die Förderung geschieht vollkommen kontinuierlich. Das Medium kommt nur mit Teflon in Berührung. Die Pumpe ist stets selbstschmierend. Sterilisiert und gereinigt kann sie innerhalb von 5 Minuten werden. Die Pumpen sind leckfrei und frei von einer aus dem Packungsbereich herkommenden Kontamination.

Die Pumpen sind bei Bedarf exegeschützt ausgeführt. Die Leistung kann kontinuierlich geregelt werden. Regelgenauigkeit $\pm 1\%$, Ansaughöhe (ohne Flüss.) 205 mm H₂O, Ansaughöhe (mit Flüss.) 7300 mm H₂O, max. Druck je nach Modell 0,7—1 atm.



Modell	Leistung in cc/min	Maße in mm		
		H	Br	L
SPM-100	300	50	50	115
SP-1000	1,000	108	100	180
SP-2000	2,000	108	100	180
SP-3000	3,000	108	100	180
SP-4000	4,000	108	100	180

Generalvertretung

**K. E. Kubelik, 75 Karlsruhe 41, Baslertorstr. 64
Tel.: 0721/45552**



Um von etwas anderem zu reden...

Wir nehmen an Charles River COBS®-Ratten alle chirurgischen Veränderungen vor, die Ihren Laborzwecken entsprechen.

Wir führen Thyroidektomien, Hypophysektomien und vier weitere Endokriniektomien aus, auch Thymektomien an neugeborenen Rattenjungen. Wir können jede einzelne dieser verschiedenen chirurgischen Veränderungen, oder auch jede beliebige Kombination an jedem von Ihnen bestimmten Tier vornehmen.

Alle Mitglieder des chirurgischen Teams bei Charles River France sind Biologen, die die erforderlichen Eingriffe in schonenden Verfahren so umfassend und vollständig durchzuführen verstehen, daß die Tiere für Versuche optimal geeignet sind.

Wenn Sie chirurgisch veränderte Tiere benötigen, teilen Sie uns bitte Ihre entsprechenden Wünsche mit.

Was an Charles River Ratten zu machen ist, können Sie uns anvertrauen.

Charles River France 
76 Saint-Aubin-Lès-Elbeuf, France

wird eine Konzentration von 0,2 mmol/l, bzw. 1,0 mmol/l, die auf eine Probe mit 25 mmol/l folgt, um 100%, bzw. um 19% zu hoch gefunden.

Ferner ist bei stark lipämischen Proben in Extremfällen mit einer erheblichen Verfälschung der Ergebnisse zu rechnen. Auch die anderen von uns getesteten Enteiweißungsmittel (Tab. 3) führen bei hohen Triglyceridkonzentrationen nicht zu einer ausreichenden Klärung des Überstandes. Dieser Fehler läßt sich nur durch Mitführen eines Probenleerwertes vermeiden. Dieses Verfahren erlaubt auch die Verwendung von Perchlorsäure

zur Fällung der Proteine. Dabei spart man einen Pipettierschritt, wenn Perchlorsäure vorgelegt wird. Jedoch wird dann die Probendurchsatzgeschwindigkeit reduziert. Außerdem muß auf die automatische Nullpunktkorrektur verzichtet und der Nullabgleich alle 20 Proben überprüft werden.

Anerkennung

Für die sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche danken wir Frau CH. WEIDEMANN und Herrn D. HÖPFEL.

Literatur

1. BARTHELMAI, W. & CZOK, R. (1962), *Klin. Wschr.* 40, 585. —
2. SCHMIDT, F. H. (1961), *Klin. Wschr.* 39, 1244. — 3. RENSCHLER, H. E., WEICKER, H. & v. BAAYER, H. (1965), *Dtsch. med. Wschr.* 90, 2349. — 4. SCHMIDT, F. H. (1963), in *Fortschritte der Diabetesforschung* (Hrsg. K. Oberdisse & K. Jahnke), G. Thieme Verlag, Stuttgart. — 5. HAECKEL, R. (1972), *diese Z.* 10, 235. —
6. ROBERT, B., DE VAUX ST. CYR, CH., ROBERT, L. & GRABAR, P. (1959), *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 4, 828. — 7. WINZLER, R. J., DEVOR, A. W., MEHL, J. W. & SMYTH, J. M. (1948), *J. Clin. Invest.* 27, 609. — 8. DE VAUX ST. CYR, CH., COURCON, J. & GRABAR, P. (1958), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 40, 579. — 9. GRABAR, P., DE VAUX ST. CYR, CH. & CLEVE, H. (1960), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 42, 853. — 10. NEUBERG, C., STRAUSS, E. & LIPKIN, L. E. (1944), *Arch. Biochem. Biophysics* 4, 101. — 11. HILGER, P., HENKEL, E. & DELBRÜCK, A. (1970), *diese Z.* 8, 579. — 12. HAECKEL, R. (1970), *diese Z.* 8, 480. — 13. EGGSTEIN, M. & KREUTZ, F. H. (1966), *Klin. Wschr.* 44, 262. — 14. LEVINE, J. & ZAK, B. (1964), *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam 10, 381. — 15.
- SOMOGYI, M. (1929), *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 26, 353. —
16. SOMOGYI, M. (1930), *J. biol. Chemistry* 86, 655. — 17. SOMOGYI, M. (1945), *J. biol. Chemistry* 160, 69. — 18. KAISER, H. (1965), *Z. analyt. Chem.* 209, 1. — 19. HAECKEL, R. & HAECKEL, H. (1971), *diese Z.* 9, 278. — 20. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. (1971), *diese Z.* 9, 497. — 21. NETHALER, H. (1970), in H. U. Bergmeyer, *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, p. 152. — 22. BERGMAYER, H. U. (1970), *Methoden der Enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, p. 1167. — 23. OUCLEY, J. L., SCATHARD, G. & BROWN, A. (1947), *J. Phys. Coll. Chem.* 51, 184. — 24. HJELM, M. (1968), *Z. analyt. Chem.* 243, 781. — 25. HAECKEL, R. & PORTH, A. J. (1972), *diese Z.* 10, 91 (1972). — 26. BARTHELMAI, W. (1969), *Monatsschr. Kinderheilkunde* 117, 264. — 27. PFLEIDERER, G. & GREIN, L. (1957), *Biochem. Z.* 328, 499. — 28. STORK, H. & SCHMIDT, F. H. (1968), *Klin. Wschr.* 46, 789. — 29. DA FONSECA-WOLLHEIM, F. (1971), *diese Z.* 9, 497. — 30. HORVATH, A. A. (1946), *Analytic. Chem.* 18, 229.

Priv. Doz. Dr. R. Haeckel
3 Hannover
Karl-Wiechert-Allee 9